Aula 4

MICROSCOPIA ELETRÔNICA

META

Explicar as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:
entender o funcionamento do microscópio eletrônico.

PRÉ-REQUISITO

O aluno deverá estudar o conteúdo das aulas 1, 2 e 3 para poder comparar as técnicas de microscopia ótica com as do microscópio eletrônico.

Fabiana Silva Vieira

INTRODUÇÃO

Nesta aula, abordaremos a microscopia eletrônica, tipos de microscópios, seu funcionamento e as técnicas para preparação do material. Você deve estar lembrado das aulas anteriores, quando tratamos de resolução e mostramos que o poder resolvente do microscópio de luz é limitado em 0,2 ìm, devido ao comprimento de onda utilizada, que impede o aumento do valor da abertura numérica. A única forma de aumentar o poder de resolução consiste em diminuir o comprimento de onda da radiação. Por isso, fez-se necessário desenvolver equipamentos que empregassem outra forma de radiação, e é neste momento que a história do microscópio eletrônico (ME) começa.

Modelo de microscópio ótico (Fonte: http://fap01.if.usp.br).

EVOLUÇÃO DO ME

O aperfeiçoamento da microscopia eletrônica está intimamente associado ao progresso alcançado pela Biologia nos últimos anos. Na década de 1930, o físico alemão **Ernest Ruska** construiu o primeiro microscópio eletrônico e, em 1986, recebeu o prêmio Nobel de Física por sua invenção. Em 1939, a Siemens construía modelos comerciais. Durante os anos 1940 e 1950, Albert Claude, Keith Porter e George Palade usaram pela primeira vez o ME em análises de amostras biológicas.

Ver glossário no final da Aula

Ao contrário do MO, que se utiliza da radiação de ondas luminosas refratadas através de lente de vidro, no ME a radiação empregada é a de feixe de elétrons refratados por meio de lentes eletromagnéticas. O comprimento de onda dos elétrons é cerca de 100.000 vezes menor do que o da luz, garantindo, assim, uma melhoria na resolução que pode chegar a 0,2 nm.

O microscópio eletrônico funciona sob vácuo para impedir a colisão dos elétrons com o ar, desviando a trajetória deles, queima do filamento e condensação dos vapores de água, metais e gorduras sobre os componentes do microscópio, danificando-os. Para o estudo de estruturas biológicas, existem dois tipos de microscópios eletrônicos amplamente empregados: microscópio eletrônico de transmissão (MET) e o microscópio eletrônico de varredura (MEV). É sobre essas duas modalidades que iremos tratar a seguir.

MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO

No microscópio eletrônico de transmissão, a imagem é formada simultaneamente à passagem do feixe de elétrons através do espécime. Como os feixes de elétrons são imperceptíveis ao olho humano, a imagem final é vista através de uma tela fosforescente ou sobre uma placa fotográfica se pretendermos registrar a imagem de forma permanente. O emprego do MET é bastante difundido no estudo de materiais biológicos, pois ele é ideal na definição de imagens intracelulares, permitindo estudos de morfologia celular, aspectos gerais das organelas e também da interação de parasitas com as células, fornecendo informações sobre alterações ocasionadas por vírus, bactérias e outros organismos diminutos de impossível visualização na microscopia de luz.

O comprimento de onda dos elétrons pode chegar a 0,004 nm, o que permitiria uma resolução de 0,002 nm e um aumento de 1 000 000x. Mas na prática, em função das imperfeições da lente e da abertura numérica, o poder resolvente máximo do MET é de 0,2 nm e o aumento real não passa de 300 000x. O princípio de funcionamento do MO e do MET é

basicamente o mesmo. A seguir, apresentamos um quadro com dados comparativos entre esses equipamentos (Tabela 1).

Características	MO	MET
Fonte	luz visível	elétrons
Tipo de lentes	vidro	eletromagnética
Comprimento de onda	0,5 μm	0,05 Å
Limite de resolução	0,2 μm	0,2 nm
Espessura dos cortes	5 a 10 μm	0,02 a 0,1 μm
Formação da imagem	transparência	eletrolucidez

Tabela 1. Quadro comparativo entre os componentes do microscópio ótico (MO) e os do microscópio eletrônico de transmissão (MET).

COMPONENTES DO MET

Neste item, vamos compreender melhor como o MET está estruturado. O MET é formado por um sistema de iluminação composto pelo canhão eletrônico, lente condensadora e por um sistema de imagens constituído pelas lentes objetivas, intermediárias e projetoras (Figuras 1 e 2).
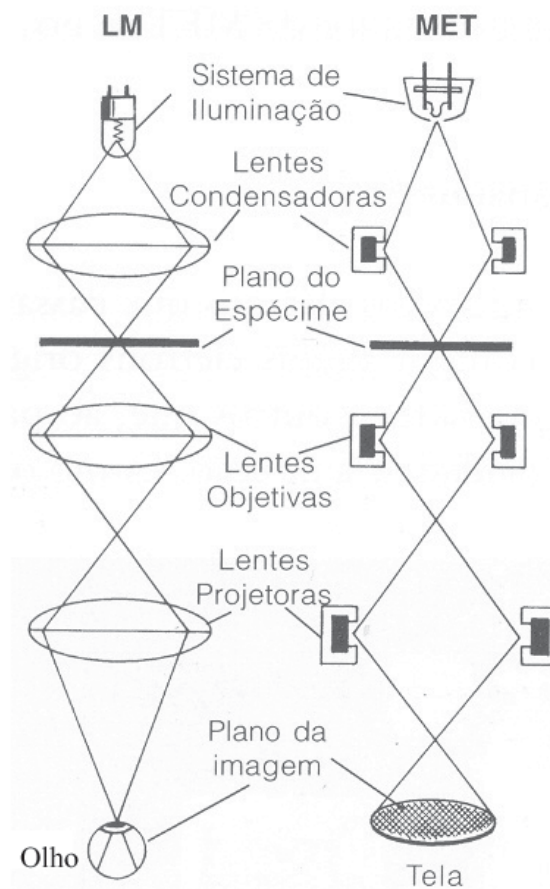
Figura 1. Esquema comparativo dos microscópios ótico e eletrônico de transmissão (Fonte: Leal, 2000).
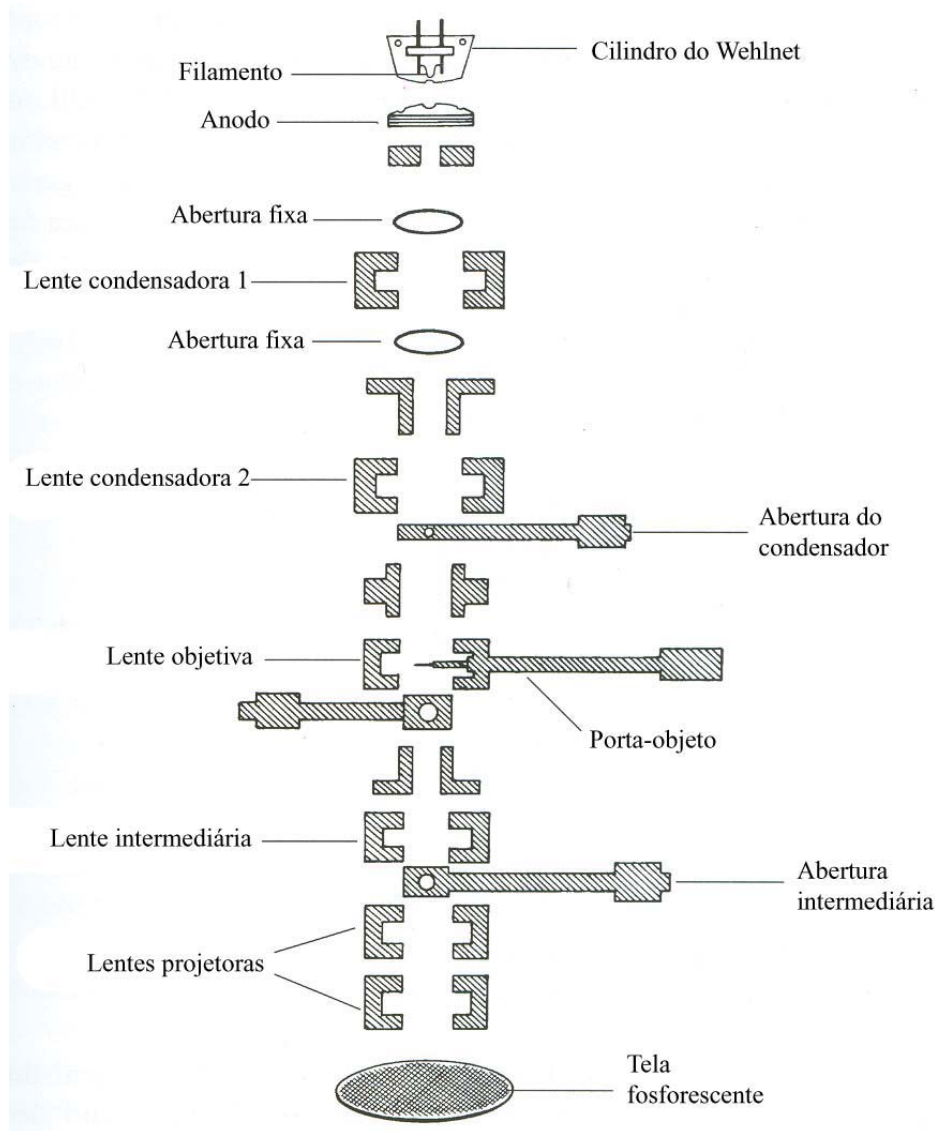
Figura 2. Esquema da organização geral do microscópio eletrônico de transmissão. Fonte: Leal, 2000

CANHÃO ELETRÔNICO

É a fonte de iluminação do MET e é composto por um filamento de tungstênio, mesmo metal utilizado nos filamentos de lâmpadas incandescentes, em forma de "V", que funciona como um cátodo composto de íons e elétrons livres. Uma alta voltagem (que varia entre 50, 80, 100 e 120 ou mais KV) é aplicada sobre esse filamento, gerando uma corrente que flui através dele e o incandesce, emitindo elétrons. A propriedade de emitir elétrons por aquecimento é comum a todos os metais e chama-se emissão termoiônica. O comprimento de onda dos elétrons está diretamente relacionado à voltagem aplicada sobre o filamento. Quanto maior for a voltagem, menor será o comprimento de onda dos elétrons, favorecendo o poder resolvente.

O filamento de tungstênio fica envolvido por uma caixa carregada negativamente, denominada escudo de Wehnelt. Nesse escudo há um furo central de abertura entre 2 a 3 mm, por onde passam os elétrons que são atraídos por um ânodo posicionado logo abaixo e direcionado para as lentes eletromagnéticas (Figura 3).
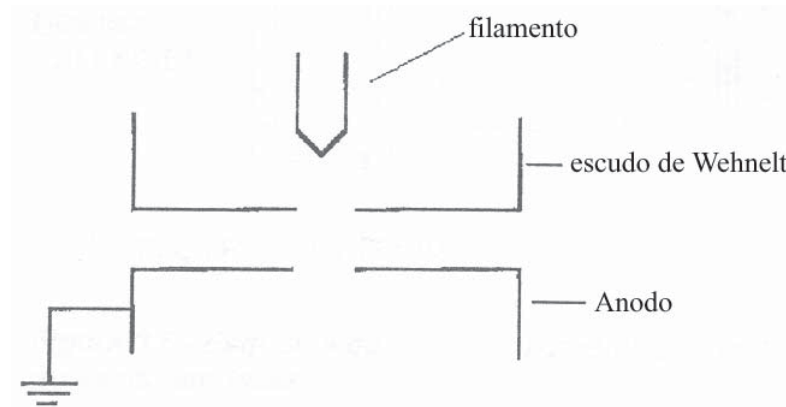
Figura 3. Esquema do canhão eletrônico. (Fonte: Grimstone, 1980).

LENTES

As lentes são de natureza eletromagnética e constituídas por uma bobina cilíndrica chamada **solenóides**, formada por milhares de voltas de fio, através da qual passa uma corrente elétrica e será utilizada para focalizar a imagem de um espécime. A distância entre o centro da lente e o ponto de convergência dos elétrons é chamada distância focal. Enquanto no microscópio ótico a focagem da objetiva é obtida pelo deslocamento mecânico da lente ou do espécime, no microscópio eletrônico a focagem é feita por variação da corrente que passa pelo solenóide ou alterando-se a aceleração de voltagem, o que afeta a distância focal da objetiva. A variação da ampliação é feita pela variação da distância focal das lentes fixas.

As primeiras lentes encontradas são as condensadoras, situadas abaixo do ânodo, cuja função é focar o feixe eletrônico sobre o material estudado. O MET apresenta duas lentes condensadoras, a C1 e a C2, numa tentativa de ter um controle maior sobre a iluminação, atingindo somente o campo de observação. Após as condensadoras, encontra-se o espécime a ser analisado. Abaixo deste estão as lentes objetivas que, assim como no MO, são responsáveis pela ampliação da imagem. Essa imagem será subseqüentemente ampliada pelas lentes intermediárias e projetoras. A lente projetora não só confere uma ampliação suplementar, mas também capta a imagem final sobre uma tela fosforescente ou sobre uma placa fotográfica.

MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi comercializado pela primeira vez em 1965 e, desde então, tem sido extremamente utilizado em muitos tipos de pesquisa biológica, con tribuindo para o estudo de organismos inteiros, tecidos e órgãos (Figuras 4 e 5).
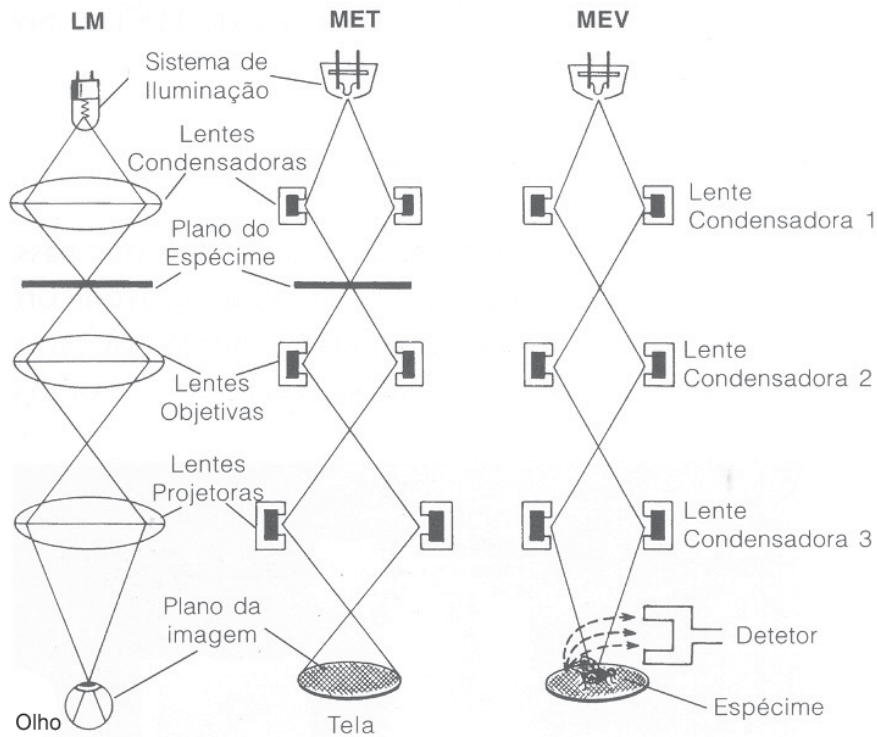
Figura 4. Esquema comparativo entre os microscópios ótico e os eletrônicos de transmissão e de varredura. (Fonte: Leal, 2000).
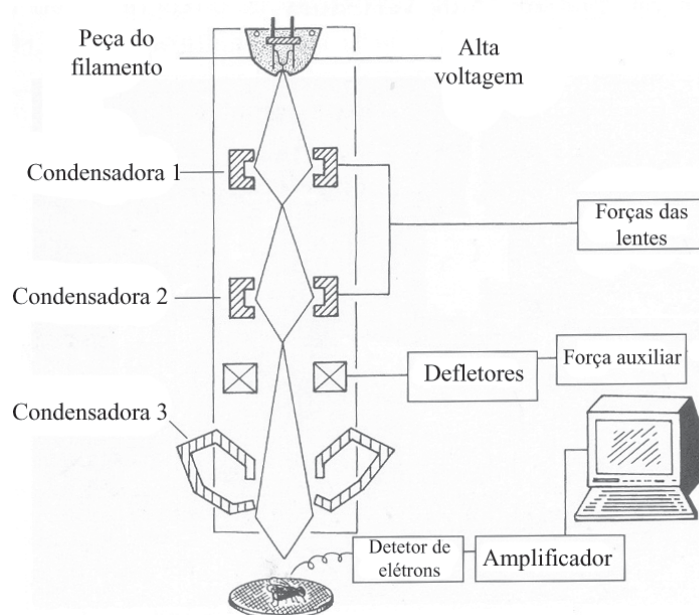
Figura 5. Organização geral do microscópio eletrônico de varredura. (Fonte: Leal, 2000).

A principal característica desse microscópio é que o feixe de elétrons não atravessa a preparação, mas, ao invés disso, varre a superfície da amostra, fornecendo uma imagem tridimensional. No MEV são utilizados os elétrons secundários ou retroespalhados na geração da imagem final. Os elétrons secundários são produzidos na superfície da amostra, após a irradiação pelo feixe incidente, e são captados por um coletor especial, produzindo a imagem no monitor (Figura 6).
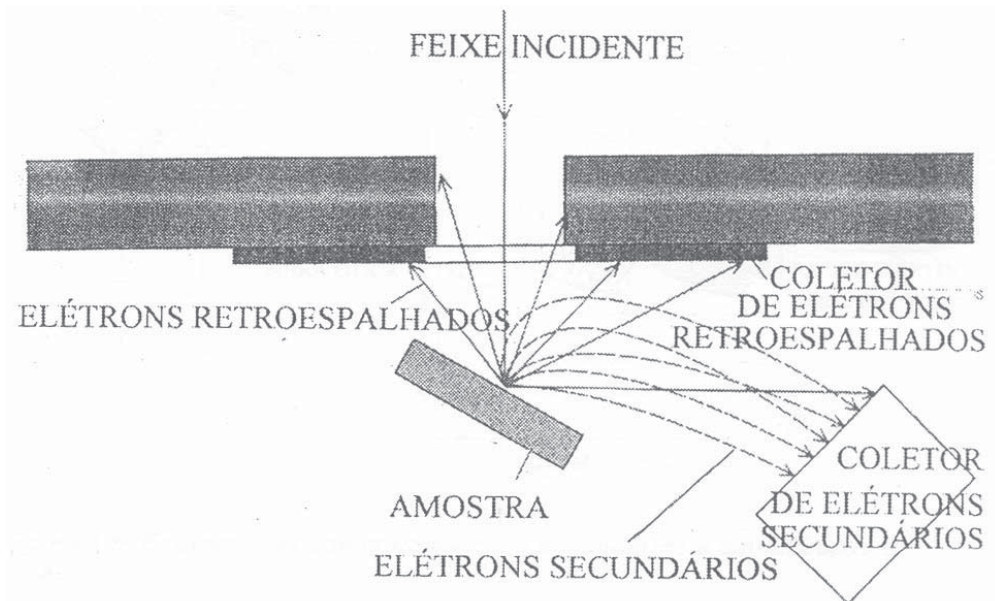
Figura 6 - Representação da geração e coleta dos elétrons secundários. (Fonte: Benchimol et.al, 1986)

O poder de resolução do MEV é de 10 nm, sendo, portanto, menor do que o alcançado pelo MET, e seus componentes são semelhantes aos do MET. Observe, a seguir, a descrição de cada um deles.

COMPONENTES DO MEV

Canhão eletrônico

É o mesmo descrito para o MET. Nele há um filamento de tungstênio que emite elétrons ao ser aquecido até o ponto de emissão termoiônica.

LENTES

As lentes eletromagnéticas ficam imediatamente abaixo do canhão, perfazendo um total de três: condensadoras C1, C2, e C3, sendo esta última também chamada de objetiva. A função delas é contribuir para a focalização do feixe de elétrons sobre a amostra. Logo em seguida, está o

compartimento do porta-objeto, que permite o deslocamento nos eixos X, Y e Z (altura), além de girar e inclinar (Figura 6).

CONCLUSÃO

O desenvolvimento da microscopia eletrônica foi importante por contribuir para uma melhor compreensão dos aspectos ultra-estruturais das células que eram, até então, desconhecidos. Dois equipamentos muito utilizados são o MET e o MEV. O MET é útil para o estudo de estruturas internas. Por meio de cortes extremamente finos é possível fazer a observação de moléculas ou de estruturas subcelulares. O MEV é ideal para visualizar a superfície do espécime, pois fornece uma imagem em 3D.

Para a escolha da melhor modalidade, você deve ter sempre em mente o objetivo da pesquisa que está desenvolvendo, pois é ele que indicará o equipamento a ser empregado para atingir os resultados desejados.

RESUMO

O princípio do funcionamento do microscópio eletrônico é a utilização de feixe de elétron para formação de imagens, resultando no maior aumento de resolução. Duas modalidades foram abordadas nesta aula: o MET e o MEV. A estrutura básica desses equipamentos é semelhante. A coluna, mantida sob vácuo, contém na parte superior uma fonte geradora de elétrons chamada de canhão eletrônico. O canhão, que representa a fonte de iluminação, é seguido por um conjunto de lentes eletromagnéticas, responsáveis pela condensação dos feixes e pelo aumento e projeção da imagem. O MET e o MEV diferem nas suas propriedades. O MET, com resolução de 0,02 nm, permite a visualização de ultra-estruturas celulares como organelas. O MEV é útil para estudos de morfologia e taxonomia, pois fornece uma imagem em 3D e tem seu poder de resolução estabelecido em 10 nm.

ATIVIDADES

1. Quais as principais diferenças entre o microscópio ótico e o eletrônico?
2. Como é a imagem gerada pelo MEV? Qual a vantagem que ela apresenta?

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

1. Esta questão foi elaborada para que você possa fazer uma associação entre o microscópio ótico e o eletrônico, observando as vantagens e desvantagens destes equipamentos.
2. Saber escolher o microscópio que iremos trabalhar depende do nosso objetivo. Respondendo a esta questão, você demonstra que conseguiu entender este ponto.

REFERÊNCIAS

BENCHIMOL, Marlene et al. **Métodos de estudo de célula.** Rio de Janeiro: Teatral, 1996.
COOPER, Geoffrey M. **A célula:** uma abordagem molecular. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2005.
DE ROBERTIS, Eduardo; HIB, José; PONZIO, Roberto. **Biologia celular e molecular.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
GRIMSTONE, Albert Victor. **O microscópio eletrônico em biologia.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 1980.
HADDAD, Antonio et al. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica:** técnicas básicas. v. 1, Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1989.
JUNQUEIRA, Luis Carlos Uchôa; CARNEIRO, José. **Biologia celular e molecular.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
LEAL, Luiz Henrique Monteiro. **Fundamentos de microscopia.** Rio de Janeiro: UERJ, 2000.
VALLE, Francisco das Chagas. **Práticas de citologia e genética.** Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

GLÓSSARIO

Ernest Ruska: Inventor do microscópio eletrônico de transmissão, junto a Max Knoll, em 1931 (1906 - 1988). Durante sua vida, desenvolveu numerosas investigações para o pogresso do microscópio eletrônico. Morreu em 1988, em Berlim Ocidental, com oitenta e um anos.

Mais informações acesse o site: http://super. abril.com.br/superarquivo/1990/conteudo_112046.shtml

Solenóides: Um campo magnético radialmente simétrico atuando como uma lente que pode ser usada para focalizar um feixe eletrônico. Na prática, a lente eletrônica consiste basicamente de uma bobina, formada por milhares de voltas de fio, através da qual passa uma corrente.